



ISSN 1518-4277

Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 81

Produção de haplóides androgenéticos em milho

Glacy Jaqueline da Silva
Cláudia Teixeira Guimarães
Sidney Netto Parentoni
Marcelo Rabel
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Edilson Paiva

Sete Lagoas, MG
2009



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos
Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin,
Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição

1ª impressão (2009): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Produção de haplóides androgenéticos em milho / Glacy Jaqueline da Silva ... [et al.]. — Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

17 p. (Documentos/Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277 ; 81).

1. Milho. 2. Genética vegetal. 3. Melhoramento genético vegetal. I. Silva, Glacy Jaqueline da. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

© Embrapa 2009



Autores

Glacy Jaqueline da Silva

Bióloga, MSc. Biotecnologia Vegetal - (Bolsista)
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
glacy.jaqueline@gmail.com

Cláudia Teixeira Guimarães

Eng. Agr., PhD Genética Molecular de Plantas
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
claudia@cnpmc.embrapa.br

Sidney Netto Parentoni

Eng. Agr., PhD Genética e Melhoramento de Plantas
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
sidney@cnpmc.embrapa.br

Marcelo Rabel

Biólogo, MSc. Biotecnologia Vegetal - (Bolsista)
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
marcelorabel@gmail.com

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Químico, MSc. Genética Molecular
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151
35701-970 Sete Lagoas, MG
ubiraci@cnpmc.embrapa.br

Edilson Paiva

Eng. Agr., Ph.D Biotecnologia Vegetal



Sumário

1. A cultura do milho	7
2. O milho híbrido	8
3. Obtenção de linhagens haplóides de milho	9
4. Sistema gametófito indeterminado (ig1)	11
5. Obtenção de linhagens duplo haplóides	14
6. Referências	14



Produção de haplóides androgenéticos em milho

Glacy Jaqueline da Silva

Cláudia Teixeira Guimarães

Sidney Netto Parentoni

Marcelo Rabel

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Edilson Paiva

1. A cultura do milho

O milho (*Zea mays L.*) é uma espécie da família das gramíneas, sendo o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz (FAO, 2008). No Brasil, a produção de milho vem crescendo ano após ano, sendo que na safra 2007/08 a colheita foi de cerca de 58,59 milhões de toneladas, 14% superior à safra 2006/07 (CONAB, 2008).

Os maiores consumidores de milho no Brasil são os criadores de aves (para corte e postura) e de suínos, que utilizam o milho para a produção de ração (IBGE, 2009). Seu uso não se restringe à indústria alimentícia, já que o milho é largamente utilizado na produção de elementos espessantes e colantes, além da produção de óleos. Recentemente, a Europa e os Estados Unidos têm incentivado seu uso para produção de etanol. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado *in natura*, como milho verde e na forma de subprodutos como pão, farinha e massas (PINAZZA; ALIMANDRO, 1998).

2. O milho híbrido

Em 1909, George Harrison Shull sugeriu um método de melhoramento de milho visando à produção de milho híbrido, que apresentou uma notável contribuição para o avanço da agricultura mundial, dando suporte ao desenvolvimento de uma vigorosa e competitiva indústria de sementes (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1978; PATERNIANI, 1993). O método do milho híbrido baseia-se na produção de linhagens endogâmicas, que são obtidas após sucessivas autofecundações, onde o pólen de cada planta é coletado da parte masculina (pendão) e depositado sobre a parte feminina (estigma) da mesma planta. Em geral, após seis a sete autofecundações, que levam de 3 a 4 anos, obtém-se uma nova linhagem (Figura 1) (BUENO et al., 2001). Têm-se como vantagens da utilização de híbridos de milho a associação de características de distintos genitores, a exploração de interações gênicas e da heterose na geração híbrida e a produção de genótipos uniformes (PATERNIANI, 1974). No entanto, em um programa para o desenvolvimento de milho híbrido, a etapa mais onerosa e demorada é a obtenção e a avaliação das linhagens endogâmicas.

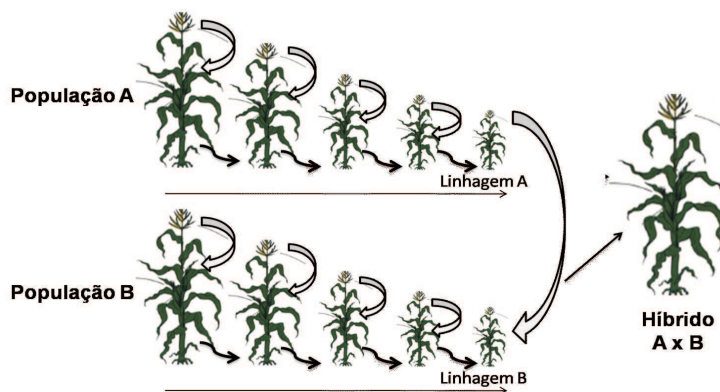


Figura 1. Produção de linhagens endogâmicas para obtenção de milho híbrido. Figura adaptada de Bueno et al. (2001).



3. Obtenção de linhagens haplóides de milho

Uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar a obtenção de linhagens puras consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados, também conhecidos como duplo haplóides (CHASE, 1952). A grande vantagem desse método consiste na diminuição do tempo para a obtenção das linhagens homozigóticas, após o cruzamento de um híbrido com um indutor de haploidia. Empresas de melhoramento genético de milho vêm trabalhando para aumentar a porcentagem de plantas haplóides geradas por esse tipo de cruzamento.

Em um processo normal de autofecundação em espécies diplóides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores (AAbb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 em uma população F2. Entretanto, na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de 1/4 na população. Isso ocorre devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aaBB e aabb). Com a obtenção de linhas homozigotas, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (SILVA et al., 2002). No entanto, a maior vantagem desse processo está na redução significativa do tempo para a obtenção de linhagens endogâmicas.

Dois processos para a produção de haplóides são utilizados: um é baseado em técnicas de cultura de tecido (*in vitro*) e o outro por meio da indução genética (*in vivo*). Como a cultura de anteras em



10 Produção de haplóides androgenéticos em milho

milho tem se mostrado uma metodologia bastante complexa e cara (BECKERT, 1994; SANTOS; ZANETTINI, 2002), a opção mais comum tem sido pela indução genética de haploidia e a posterior duplicação cromossômica. A indução *in vivo* baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haplóides. A maioria dessas linhagens é derivada de duas linhagens temperadas, a Stock6, que gera haplóides gimnogenéticos, ou seja, de origem materna (COE JR., 1959), e a W23, que gera haplóides androgenéticos por meio de uma mutação no alelo do gene *IG*, produzindo o alelo *ig*, denominado de *gametófito indeterminado1* (KERMICLE, 1969).

A frequência de haplóides gerados com o sistema W23 (*ig1*) varia de 1 a 3% (KERMICLE, 1969, 1973). Já o sistema Stock6 possui uma frequência em torno de 3% (SARKAR; COE JR., 1966), embora várias iniciativas tenham sido realizadas no intuito de aumentar essa frequência. Lashermes e Beckert (1988) cruzaram a linhagem W23 com a linhagem Stock6 e obtiveram a linhagem indutora WS14, com uma taxa de indução de 3 a 5%. Sarkar et al. (1994) obtiveram uma taxa de indução de 6% nos cruzamentos realizados.

Os mecanismos moleculares da indução de haploidia em milho não foram totalmente compreendidos. Porém, para o caso de indutores gimnogenéticos, em que o indutor é o doador de pólen, há indícios de que, para a formação de linhagens haplóides, dois núcleos espermáticos são desenvolvidos com diferentes velocidades (BYLICH; CHALYK, 1996). Como resultado, um dos núcleos espermáticos atinge o estágio pronto para a fertilização, enquanto o outro não. A existência de somente um núcleo espermático normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e o desenvolvimento de sementes com embriões haplóides na espiga da planta que recebeu pólen de um indutor gimnogenético (ENALEEVA; TYRNOV, 1996).



4. Sistema *gametófito indeterminado* (*ig1*)

O alelo recessivo do gene *gametófito indeterminado* (*ig1*) restringe o potencial embriogênico das células, produzindo, em alguns casos, somente o genoma de um dos dois parentais (KERMICLE, 1969; EVANS, 2007). Esse alelo foi identificado como o causador de alterações significativas na estrutura dos embriões de milho (KERMICLE, 1969). Foi observado que a presença do alelo *ig1* permite a ocorrência de um número variável de divisões mitóticas, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais, em vez dos oito núcleos observados normalmente (Figura 2) (LIN, 1981; HUANG; SHERIDAN, 1996). Como resultado dessas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo *ig1* exibe heterofertilização, poliembrionia e variação no nível de ploidia do endosperma depois da fertilização.

Algumas características são atribuídas à interferência do alelo *ig1*, como sinergia múltipla no saco embrionário, oócitos múltiplos e várias células centrais (KERMICLE, 1971; LIN, 1981; HUANG; SHERIDAN, 1996; GUO et al., 2004). Essa mutação afeta também a migração nuclear e a diferenciação celular (LIN, 1981; HUANG; SHERIDAN, 1996). No saco embrionário do mutante *ig1*, a fase proliferativa é prolongada, sugerindo que a função do alelo selvagem *ig1* promova uma interrupção na proliferação da diferenciação no saco embrionário (LIN, 1981).

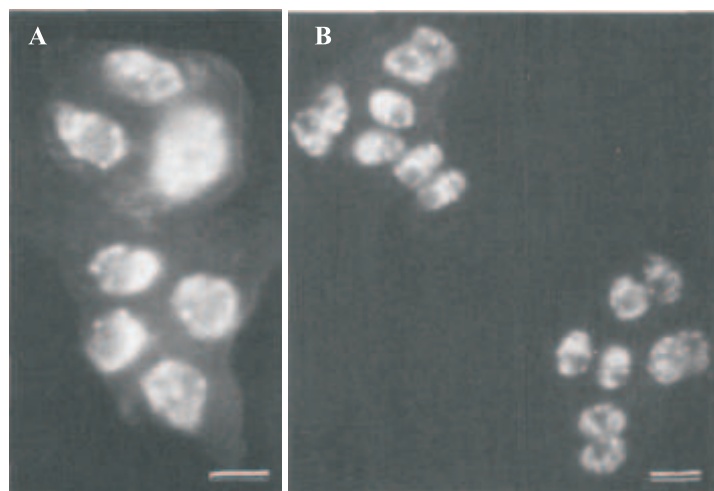


Figura 2. Comparação de um saco embrionário normal e um saco embrionário de um mutante contendo o alelo *ig1*. A) Saco embrionário normal, contendo oito núcleos polares (um núcleo polar não pode ser visualizado devido ao ângulo da fotografia), após a megagametogênese. B) Saco embrionário de um mutante contendo o alelo *ig1*, onde dezesseis núcleos estão presentes no saco embrionário. Oito núcleos estão localizados no polo micropilar e outros oito núcleos estão localizados no polo calazal. Microfotografia eletrônica de transmissão (HUANG; SHERIDAN, 1996).

O mutante *ig1* não condiciona um processo em particular; a sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário e altera a atividade de outros genes durante a formação deste. Portanto, seus efeitos pleiotrópicos parecem ser independentes, não tendo relações uns com os outros (LIN, 1981; HUANG; SHERIDAN, 1996). O gene *ig1* está localizado no braço longo do cromossomo três do milho (KERMICLE; DEMOPULOS-RODRIGUES, 1980). Segundo Evans (2007), o gene *ig1* é amplamente expresso em uma variedade de tecidos em milho, como folhas, primórdios foliares, espigas imaturas, pendão imaturo, cabelo e palha jovem. O gene *ig1*

apresenta baixa expressão no endosperma, em raízes e grãos de pólen maduro e se expressa em várias partes florais, nos diferentes estágios de desenvolvimento.

As sementes de milho que sofrem a interferência do gene *ig1*, e são consideradas haplóides, precisam ser identificadas ainda no estágio embrionário para viabilizar o processo de duplicação cromossômica. Com o objetivo de identificar as sementes haplóides, Chase e Nanda (1965) descreveram um sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação por antocianina determinado pelo gene *R-navajo* (*R1-nj*). Esse gene controla a pigmentação do endosperma e do embrião, como um marcador dominante derivado da fonte indutora. Como o endosperma é triplóide, o marcador irá se expressar em qualquer tipo de cruzamento. Mas como um embrião haplóide não possui a contribuição do genoma da linhagem indutora, que possui o alelo *R-navajo*, o marcador não irá se expressar. Assim, as sementes com a pigmentação púrpura do endosperma e a não pigmentação do embrião podem ser selecionadas como possíveis haplóides (Figura 3) (NANDA; CHASE, 1966; EDER; CHALYK, 2002).



Figura 3. Padrão de coloração do marcador morfológico controlado pelo sistema *R-navajo* (*R1-nj*). A) Endosperma e embrião roxos, indicando uma semente diplóide normal. B) Endosperma roxo e embrião branco, indicando haploidia (RABEL, 2008)

No entanto, a expressão desse gene é bastante influenciada pelo background genético e pelo processo de maturação da semente, além da existência de genes dominantes (*C1-I*, *C2-I^{df}* e *In1-ID*) que inibem a síntese de antocianina (COE, 1994; EDER; CHALYK, 2002). Tais fatores dificultam a identificação precoce de genótipos haplóides, limitando a ampla aplicação dessa metodologia em programas de melhoramento (BELICUAS et al., 2007).

5. Obtenção de linhagens duplo haplóides

Após a obtenção e a identificação de plantas haplóides, ainda é necessário que seja feito um tratamento, ainda na fase de plântula, para duplicar o número de cromossomos e restabelecer a fertilidade das plantas. Para isso, alguns métodos foram desenvolvidos e consistem basicamente em emergir a plântula em uma solução de colchicina (DEIMLING et al., 1997). A colchicina atua na desorganização das fibras do fuso durante a metáfase celular, impedindo a sua formação e a consequente disjunção dos cromossomos, resultando na duplicação dos cromossomos.

Trabalhos em andamento na Embrapa Milho e Sorgo vêm tentando compreender os mecanismos de indução de haplóides androgenéticos em milho, com a utilização do gene *gametófito indeterminado*, assim como a incorporação do gene *ig1* e o gene *R1-nj* em linhagens de milho tropicais do programa de melhoramento, para posterior utilização como uma linhagem indutora de haplóides androgenéticos.

6. Referências

BECKERT, M. A advantages and disadvantages of the use of in vitro/ in situ produced DH maize plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.).



Biotechnology in agriculture and forestry: maize. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 201-213.

BELICUAS, P. R.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, L. V.; DUARTE, J. M.; MALUF, W. R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Heidelberg, v. 156, p. 95-102, 2007.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 262 p.

BYLICH, V. G.; CHALYK, C. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei in the ZMS line. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 70, p. 33, 1996.

CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.

CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 275-276, 1965.

COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **The maize handbook**. New York: Springer-Verlag, 1994. p. 279-281.

COE JR., E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, Chicago, v. 93, p. 381-382, 1959.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Brasil conclui maior colheita de grãos da história**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=755>>. Acesso em: 8 set. 2008.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in-vivo haploideninduktion bei mais. **Vortr Pflanzenzuchtung**, Berlin, v. 38, p. 203-204, 1997.

EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize.

Theoretical Applied Genetics, Berlin, v. 104, p. 703-708, 2002.

ENALEEVA, N. K. H.; TYRNOV, V. S. Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize. **Doklady Biological Science**, v. 353, p. 225-226, 1996.

EVANS, M. M. S. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 46-62, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of food and agriculture**. Rome, 2008.

GUO, F.; HUANG, B. Q.; HAN, Y.; ZEE, S. Y. Fertilization in maize *indeterminate gametophyte1* mutant. **Protoplasma**, New York, v. 223, p. 111-120, 2004.

HUANG, B.-Q.; SHERIDAN, W. F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte 1* mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1391-1407, Aug. 1996.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 28 set. 2009.

KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v. 166, n. 3911, p. 1422-1424, 1969.

KERMICLE, J. L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 58, p. 1-7, 1971.

KERMICLE, J. L. Androgenesis and the *indeterminate gametophyte (ig)* mutation: influence of pollen parent on androgenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 47, p. 207-208, 1973.



KERMICLE, J. L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of indeterminate gametophyte (*ig*) on chromosome 3. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 54, p. 84-85, 1980.

LASHERMES, P.; BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v. 76, p. 405-410, 1988.

LIN, B. Y. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v. 41, p. 557-563, 1981.

MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p. 257-309.

NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of mayze (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 213-215, 1966.

PATERNIANI, E. Effective maize pollen dispersed in the field. **Euphytica**, Wageningen, v. 23, p. 129-134, 1974.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento de milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 22-43.

PINAZZA, L. A.; ALIMANDRO, R. Cenário atípico. **Agroanalysis**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 12-17, ago. 1998.

RABEL, M. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 165-173, 2002.